

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

FITZNER, Uwe
Lintorfer Strasse 10
D-40878 Ratingen
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 13 March 2002 (13.03.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 0050/050729 BASF/NAE	
International application No. PCT/EP00/07625	International filing date (day/month/year) 05 August 2000 (05.08.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

BASF AKTIENGESELLSCHAFT
D-67056 Ludwigshafen
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

BASF PLANT SCIENCE GMBH
67056 Ludwigshafen
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

BASF AKTIENGESELLSCHAFT has assigned its rights to BASF PLANT SCIENCE GMBH.

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input checked="" type="checkbox"/> other: BASF AKTIENGESELLSCHAFT

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Alexandre BOUVIER

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 25 May 2001 (25.05.01)	
International application No. PCT/EP00/07625	Applicant's or agent's file reference 0050/050729 BASF/NAE
International filing date (day/month/year) 05 August 2000 (05.08.00)	Priority date (day/month/year) 15 September 1999 (15.09.99)
Applicant REINDL, Andreas et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

14 March 2001 (14.03.01)

☐

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Claudio Borton Telephone No.: (41-22) 338.83.38
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

2

Applicant's or agent's file reference BASF/NAE 1024/99PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/07625	International filing date (day/month/year) 05 August 2000 (05.08.00)	Priority date (day/month/year) 15 September 1999 (15.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82		
Applicant BASF PLANT SCIENCE GMBH		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 14 March 2001 (14.03.01)	Date of completion of this report 11 December 2001 (11.12.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-18, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 1-17, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages 1/4-4/4, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☒ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

Continuation of: Box I.6.

The sequence protocol submitted with the letter of 10 October 2000 (2 pages, 2 sequences) is not part of the application (PCT Rule 13ter.1(f)).

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1-17	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-17	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Documents

For the purposes of this international preliminary examination report (IPER), the documents listed in the international search report (ISR) of 28 November 2000 are abbreviated to **D1-D5** according to the sequence in which they appear in the ISR.

1 **Abstract of the application**

The present application describes the transfer of a DNA construct comprising the 35S promoter, the AATP1 sequence (*Arabidopsis thaliana* ATP/ADP translocator gene) in sense orientation, and a polyadenylation point (plasmid pBIN AR-AATP1) in a potato plant (*Solanum tuberosum*) with the help of *Agrobacterium tumefaciens* (Examples 4 and 5). The content of certain amino acids in said plant is thus increased in comparison with wild varieties of the plant (see Table 1).

2 **Novelty and inventive step (PCT Article 33(2) and (3))**

- 2.1 The subject matter of Claims 1-17 does not meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3).
- 2.2 The plants described in **D1** (Tjaden et al.) were transformed in the same way as the plants of the present application. A DNA construct comprising the 35S promoter, the AATP1 sequence (plastidic ATP/ADP translocator gene) in sense (plasmid pBIN AR-AATP1) or antisense orientation, and a polyadenylation point is transformed in a potato plant (*Solanum tuberosum*) with the help of *Agrobacterium tumefaciens* (see D1, page 538, right-hand column together with Examples 4-7 of this application; see also page 6, lines 20-22 of the present description). The overexpression of the plastidic ATP/ADP translocator gene is achieved by transforming the plants with the sense sequence (see D1, page 532, right-hand column).
- 2.3 The IPEA is also of the opinion that the words "altered such that" define such a large scope of protection that any known plant with altered regulative sequences and/or an altered gene copy number of a plastidic AATP gene prejudices the novelty of independent Claim 1. The "alteration" is not sufficiently defined as to lend novelty to the subject matter of independent Claim 1 over the prior art.
- 2.4 **D2** (WO-A-94/10320) discloses the "antisense expression" of an ATP/ADP translocator gene in potato plants (see, for example, page 4, lines 28-32

of D2). This corresponds to Examples 6 and 7 of the present application. In contrast to the present application, **D2** uses a mitochondrial ATP/ADP transporter. The feature of the "plastidic" ATP/ADP transporter is not, however, included in independent Claim 1. **D2** therefore prejudices the novelty of the subject matter of Claims 1, 3, 5, 13, 14, 16 and 17.

2.5 **D1** and **D2** do not specify the content of essential amino acids. Since the methods of **D1** and **D2** and that of the present application do not differ (result: increased or reduced quantity of an ATP/ADP translocator protein), the result of the methods (increased or reduced quantity of certain amino acids) is an inherent feature of the transformed plants of **D1** and **D2**. The subject matter of Claims 1-5 and 13-17 therefore cannot be distinguished from the transformed plants and methods of **D1** and **D2** (PCT Article 33(2) and (3)).

2.6 Independent Claim 6 relates to a gene sequence *per se*. The DNA sequence, obtainable under the EMBL Accession Number Z49227, was already described in **D3** (Kampfenkel 374: 351-355) and **D4** (Z49227).

D4 contains no technical teaching on how to proceed technically. It is, however, pointed out that indications concerning an intended type of use (Claim 6: "...for use in a plant...") in a claim directed to an object cannot be regarded as distinguishing features, i.e. the claim relates to the product *per se* (PCT Guidelines, Chapter IV-7.6). The subject matter of Claims 6-12 is therefore not allowable under PCT Article 33(2) and (3).

- 2.7 A "method for increasing the content of essential amino acids in a plant" characterised by the features of Claim 15 would have been considered novel by this authority.

3 **Industrial applicability (PCT Article 33(4))**

Claims 1-17 meet the requirements of PCT Article 33(4).

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
WO-A-9958654	18 November 1999 (18.11.1999)	12 May 1999 (12.05.1999)	13 May 1998 (13.05.1998)

See annexe

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>
---------------------------------------	------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Box VI

The above document was published between the priority date and the filing date of the present application and is therefore not considered to be prior art under PCT Rule 64.1(b). WO-A-99/58654 (D5), however, claims an earlier priority date than the present application and will therefore be relevant to the assessment of the novelty of the claimed subject matter in the regional phase. D5 discloses transformed plants and derivatives thereof, the genetic modification consisting in the introduction of an ADP/ATP translocator gene (AATP) from *Arabidopsis thaliana*.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS


PCT

EP00 14 DEC 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T16

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts BASF/NAE 1024/99 PCT		WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07625	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 05/08/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 15/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/82		
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung 		
Datum der Einreichung des Antrags 14/03/2001		Datum der Fertigstellung dieses Berichts 11.12.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Bevollmächtigter Bediensteter Herrmann, K Tel. Nr. +49 89 2399 2670



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-18 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-17 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-2, eingereicht mit Schreiben vom 10.10.00.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbaren **Nucleotid- und/oder Aminosäures** **sequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-17
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-17
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

Dokument

Für diesen internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (IPER) werden die Dokumente des internationalen Recherchenbericht (ISR) vom 28.11.00 in der dort angegebenen Reihenfolge mit **D1-D5** abgekürzt.

Zu PUNKT I (Grundlage des Bescheids)

Das mit Schreiben vom 10.10.00 eingereichte Sequenzprotokoll (2 Seiten, 2 Sequenzen) ist nicht Bestandteil der Anmeldung (Regel 13ter.1(f) PCT).

Zu PUNKT V (Neuheit, erfinderische Tätigkeit, gewerbl. Anwendbarkeit)

1 Zusammenfassung der Anmeldung

Die vorliegende Anmeldung beschreibt das Transferieren eines DNA-Konstrukts bestehend aus 35S-Promoter, AATP1-Sequenz (*Arabidopsis thaliana* ATP/ADP-Translokator-Gen) in Sense-Orientierung und einer Polyadenylierungsstelle (Plasmid pBIN AR-AATP1) in eine Kartoffelpflanze (*Solanum tuberosum*) mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* (Beispiele 4 und 5). Der Gehalt an bestimmten Aminosäuren wird dadurch, im Vergleich zum Wildtyp in besagter Pflanze erhöht (siehe Tabelle 1).

2 Neuheit und erfinderische Tätigkeit (Art. 33(2) und (3) PCT)

- 2.1 Der Gegenstand der Ansprüche 1-17 erfüllt nicht die Anforderungen von Art. 33(2) und 33(3) PCT.
- 2.2 Die in **D1** (Tjaden et al.) beschriebenen Pflanzen sind auf gleiche Weise transformiert worden wie die Pflanzen der vorliegenden Anmeldung. Ein DNA-Konstrukt, bestehend aus 35S-Promoter, AATP1-Sequenz (plastidäres ATP/ADP-Translokator-Gen) in Sense- (Plasmid pBIN AR-AATP1) oder Antisense-Orientierung und einer Polyadenylierungsstelle wird in eine Kartoffelpflanze (*Solanum tuberosum*) mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* transformiert (vgl. D1, S. 538, rechte Spalte mit Beispielen 4-7 dieser Anmeldung; siehe auch S. 6,

Z. 20-22 der vorliegenden Beschreibung). Durch die Transformation der Pflanzen mit der Sense-Sequenz wird die Überexpression des plastidären ATP/ADP-Translokator-Gens erreicht (siehe D1, S. 532, rechte Spalte).

- 2.3 Die IPEA ist ausserdem der Auffassung, dass der Ausdruck "derart verändert" einen solch grossen Schutzzumfang verleiht, so dass jede bekannte Pflanze mit veränderten regulativen Sequenzen und/oder veränderter Genkopienzahl eines plastidären ATP-Gens neuheitsschädlich für den Gegenstand des unabhängigen Anspruchs 1 ist. Die "Veränderung" ist nicht ausreichend definiert um dem Gegenstand des unabhängigen Anspruchs 1 gegenüber dem Stand der Technik Neuheit zu verleihen.
- 2.4 **D2** (WO9410320) offenbart die "Antisense-Expression" eines ATP/ADP-Translokator-Gens in Kartoffelpflanzen (siehe z.B. S. 4, Z. 28-32 von D2). Dies entspricht den Beispielen 6 und 7 der vorliegenden Anmeldung. Im Gegensatz zur vorliegenden Anmeldung wird in **D2** ein mitochondrialer ATP/ADP-Transporter verwendet. Das Merkmal "plastidärer" ATP/ADP-Transporter ist im unabhängigen Anspruch 1 jedoch nicht enthalten. **D2** ist somit neuheitsschädlich für den Gegenstand der Ansprüche 1, 3, 5, 13, 14, 16 und 17.
- 2.5 In **D1** und **D2** wird der Gehalt an essentiellen Aminosäuren nicht angegeben. Da sich die Methoden von **D1** und **D2** und der vorliegenden Anmeldung nicht unterscheiden (Ergebnis: erhöhte oder erniedrigte Menge eines ATP/ADP-Translokator-Proteins), handelt es sich bei dem Resultat der Methoden (erhöhter bzw. erniedrigter Gehalt an bestimmten Aminosäuren) um ein inhärentes Merkmal der transformierten Pflanzen von **D1** und **D2**. Der Gegenstand der Ansprüche 1-5 und 13-17 ist daher nicht von den transformierten Pflanzen und Methoden von **D1** und **D2** zu unterscheiden (Art. 33(2) und (3) PCT).
- 2.6 Der unabhängige Anspruch 6 bezieht sich auf ein Gensequenz *per se*. Die DNA-Sequenz, erhältlich unter der EMBL Accession Nummer Z49227, wurde bereits in **D3** (Kampfenkel 374:351-355) und **D4** (Z49227) beschrieben.
- D4** enthält keine technische Lehre zum technischen Handeln. Es wird jedoch darauf hingewiesen, daß Angaben über eine beabsichtigte Art der Verwendung

(Anspruch 6: "...zum Einsatz in einer Pflanze...") bei einem auf einen Gegenstand gerichteten Anspruch nicht als Unterscheidungsmerkmale anzusehen sind, d.h. der Anspruch bezieht sich auf das Produkt *per se* (PCT Richtlinien IV-7.6). Der Gegenstand der Ansprüche 6-12 ist daher nicht gewährbar unter Art. 33(2) und (3) PCT.

- 2.7 Ein "Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an essentiellen Aminosäuren in einer Pflanze", gekennzeichnet nach den Merkmalen von Anspruch 15, wäre von dieser Behörde als neu angesehen worden.

3 Industrielle Verwertbarkeit (Art. 33(4) PCT)

Ansprüche 1-17 erfüllen die Anforderungen von Art. 33(4) PCT.

Zu PUNKT VI Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
WO-A-9958654	18.11.99	12.05.99	13.05.98

Besagtes Dokument ist zwischen dem Prioritätstag und dem Anmeldetag der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht worden und ist daher nicht als Stand der Technik im Sinne von Regel 64(1)(b) PCT anzusehen. WO9958654 (**D5**) beansprucht jedoch ein früheres Prioritätsdatum als die vorliegende Anmeldung und wird daher in der regionalen Phase für die Beurteilung der Neuheit des beanspruchten Gegenstands von Bedeutung sein. **D5** offenbart transformierte Pflanzen und deren Nachkommen, wobei die genetische Modifikation in der Einführung eines ADP/ATP-Translokator-Gens (AATP) aus *Arabidopsis thaliana* besteht.

Pflanzen mit verändertem Aminosäuregehalt und Verfahren zu deren Herstellung

Die vorliegende Erfindung betrifft transformierte Pflanzen und deren
5 Nachkommen, die in den regulativen Sequenzen und/oder der
Genkopienzahl des ATP/ADP-Translokator-Gens derart verändert sind,
daß sie gegenüber einer nicht transformierten Pflanze eine bis mehrere
Aminosäuren gleichzeitig in veränderten Mengen aufweisen. Ferner
betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung dieser
10 Pflanzen sowie deren Verwendung als Nutzpflanze oder in Bereichen der
Futtermittelindustrie.

Menschen und Tiere können lediglich 11 der 20 Aminosäuren
synthetisieren und sind deshalb auf eine Aufnahme der 9 sogenannten
15 essentiellen Aminosäuren durch die Nahrung angewiesen. Die
Nahrungsgrundlage von Menschen und Vieh basiert zum größten Teil auf
pflanzlichen Komponenten. Zu den essentiellen Aminosäuren gehören
Lysin, Tryptophan, Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Threonin,
Phenylalanin und Histidin.

20 Ein Problem entsteht durch die oftmals nur sehr geringen Konzentrationen
dieser Aminosäuren in Nahrungspflanzen. Aus diesem Grund werden
häufig Körnermischungen und Gemüse-basierte Nahrungsmittel mit
synthetisch hergestellten Aminosäuren supplementiert, um deren
25 Nährwert zu erhöhen.

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Wege beschritten, um die
Mengen an freien, d.h. nicht in Proteinen gebundenen Aminosäuren zu
erhöhen. Diese Versuche konzentrierten sich jedoch vor allem auf die
30 klassische Züchtung sowie auf die Selektion von Mutanten.

In der jüngeren Vergangenheit wurde zunehmend versucht, die Mengen an essentiellen Aminosäuren durch die Anwendung molekulargenetischer Techniken zu erhöhen. WO 97/28247, WO 98/13506 und WO 97/35023 beschreiben erste Versuche, die sich auf die heterologe Expression eines
5 samenspezifischen Speicherproteins erstrecken, welches reich an Lysin oder Methionin ist. Nachteilig ist hierbei die Speicherung der Aminosäuren in Proteinen, d.h. es handelt sich auch hier um eine Erhöhung an gebundenen Aminosäuren.

10 Ferner sind zahlreiche Versuche zur direkten Beeinflussung der Aminosäure-Biosynthese bekannt. Hier wurden einzelne Gene kodierend für bestimmte Aminosäure-Biosyntheseenzyme in Pflanzen überexprimiert, resultierend in einer Erhöhung des jeweiligen Biosyntheseendprodukts.

15 Alternativ dazu wurde außerdem versucht, Enzyme in ihren Reaktionskinetiken zu beeinflussen. Hierbei stellt insbesondere die sogenannte Produkthemmung von Enzymen ein Problem dar. Beispielsweise beschreiben Shaul und Galili (1993); Plant Mol Biol 23:
20 759-768) bzw. Falco et al (1995; Bio/Technology 13: 577-582) Pflanzen, die freies Lysin überproduzieren, einhergehend mit einer Abnahme von freiem Threonin. Verantwortlich hierfür ist die Aspartatkinase, dem ersten Enzym der Biosynthese der von Aspartat abstammenden Aminosäuren, welche durch Lysin allosterisch gehemmt wird. Zur Umgehung dieser
25 Feedback-Hemmung wurden gentechnisch modifizierte Gene, der Aspartatkinase in Pflanzen überexprimiert (WO 94/25605). Diese veränderte Aspartatkinase verfügt über eine stark verringerte Feedback-Inhibition durch Lysin und Threonin, was zu einer Zunahme an Lysin führt. Diese für die Feedback-Hemmung durch Lysin insensitive Aspartatkinase
30 wurden außerdem zusammen mit anderen Biosyntheseenzymen überexprimiert. Entsprechende Versuche wurden in Corynebakterien

durchgeführt (1991, Applied and Environmental Microbiology 57: 1746-1752). In diesen Bakterien kommt es jedoch neben einer Zunahme von Lysin auch zu einer starken Abnahme in der Wachstumsgeschwindigkeit, was sich wiederum negativ auf die Lysinbilanz auswirkt.

5

Versuche mit Pflanzen, die sowohl eine Feedback-insensitive Aspartatkinase als auch eine Feedback-insensitive Dihydropicolinat-Synthase besitzen, sind bei Shaul und Galili (1993; Plant Mol Biol 23: 759-768) beschrieben. Beide Enzyme nehmen eine Schlüsselposition in der Aminosäure-Biosynthese ein. Die Überexpression dieser „Flaschenhals“-Enzyme führte jedoch nicht zu der erhofften Erhöhung beider Aminosäuren, Lysin und Threonin. Vielmehr konnte nur der Gehalt an freiem Lysin erhöht werden, wobei gleichzeitig der Gehalt an freiem Threonin drastisch sank.

15

Über die Überexpression von einem oder zwei Aminosäure-Biosynthesegenen hinaus beschreiben WO 98/56935, EP 0 854 189 und EP 0 485 970 Multi-Gen-Ansätze mit dem Ziel, die Mengen einer oder mehrerer Aminosäuren gleichzeitig in einer Pflanze zu beeinflussen. Dies setzt die genetische Modifikation einer Pflanze hinsichtlich mehrerer Gene voraus. D.h. es wäre notwendig, eine mehrfach transgene Pflanze herzustellen. Diese Verfahren sind jedoch sehr aufwendig. Außerdem bergen solche massiven Eingriffe in das pflanzliche Erbmaterial zunehmend Risiken unvorhersehbarer Nebenreaktionen in sich.

25

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, transgene Pflanzen sowie ein Verfahren zu deren Herstellung zur Verfügung zu stellen, die die zuvor genannten Nachteile nicht aufweisen.

30 Überraschender Weise wird dies erfindungsgemäß durch die Bereitstellung einer transformierten Pflanze erreicht, die in den regulativen

Sequenzen und/oder der Genkopienzahl eines ATP/ADP-Translokator-Gens derart verändert ist, daß sie gegenüber einer entsprechenden nicht transformierten Pflanze eine bis mehrere Aminosäuren in veränderten Mengen aufweist.

5

Erfindungsgemäß zeichnen sich die transformierten Pflanzen dadurch aus, daß sie überwiegend eine oder mehrere essentielle Aminosäure(n) in veränderten Mengen aufweisen.

- 10 Insbesondere weisen die erfindungsgemäßen Pflanzen eine oder mehrere essentielle Aminosäure(n) auf, deren Gehalt gegenüber der nicht transformierten Pflanzen gesteigert ist.

Bei den transformierten Pflanzen handelt es sich erfindungsgemäß um
15 Nutzpflanzen, bevorzugt wirtschaftlich relevante Pflanzen, wie beispielsweise Kartoffeln oder Mais. Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf diese Gattungen beschränkt.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich dabei sowohl auf die zuvor
20 genannten transformierten Pflanzen, deren Samen und Nachkommen als auch auf von diesen transformierten Pflanzen abgeleitetes Gewebe, Zellen oder fortpflanzungsfähiges Material.

In einer Ausführungsvariante der vorliegenden Erfindung, bei der
25 erfindungsgemäß das Gen kodierend für den ATP/ADP-Translokator in Kartoffeln überexprimiert wird, wird eine Erhöhung ernährungsphysiologisch und wirtschaftlich interessanter Aminosäuren, wie Lysin, Methionin, Threonin, Valin, Tryptophan, Histidin, Isoleucin und Leucin erreicht.

30

In der mit Linie 98 bezeichneten transformierten Pflanze ist die Menge an freiem Lysin um 28% gesteigert, in der mit Linie 62 bezeichneten transgenen Pflanze liegt die Erhöhung der freien Lysinmenge bei 25,75%. Überraschenderweise wird bereits durch eine nur 50%ige Steigerung der ATP/ADP-Translokator-Aktivität in den Pflanzen eine mindestens 25%ige Erhöhung des Lysingehaltes erreicht. Ferner ist in der Linie 98 die Menge an Methionin um 11% erhöht. Neben erhöhten Lysin- und Methioninmengen liegen ebenfalls erhöhte Mengen der essentiellen Aminosäuren Valin (12 % in Linie 98), Tryptophan (50 % in Linie 98), Threonin (12,5 % in Linie 98), Histidin (23,5 % in Linie 98 und 20 % in Linie 62), Isoleucin (25 % in Linie 98) und Leucin (40 % in Linie 98) vor.

Eine Überexpression des ATP/ADP-Translokators in Antisense-Orientierung führt entsprechend zu einer Erniedrigung der Aminosäuremengen in den jeweiligen transformierten Pflanzen, die mit Linie 594 und 595 bezeichnet sind. Für Lysin findet man hier nur noch etwa ein Viertel der Wildtyp-Lysinmenge, bei Methionin ist es noch etwa maximal ein Achtel der Wildtyp-Methioninmenge.

Eine Übersicht über das Spektrum an Aminosäuren im Wildtyp der Kartoffel *Solanum tuberosum* und in transformierten Kartoffelpflanzen ist in Tabelle 1 zusammengefaßt. In dieser Ausführungsvariante der Erfindung ist die Gesamtmenge an freien Aminosäuren in den transformierten Kartoffelpflanzen gegenüber dem Wildtyp um etwa 7% erhöht.

Ein besonderer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist es, daß durch die gesteigerte Expression eines einzigen Gens, nämlich des ATP/ADP-Translokators, eine spezifische Erhöhung mehrerer und überwiegend essentieller Aminosäuren gleichzeitig erreicht werden kann.

Erfindungsgemäß zeichnet sich die transformierte Pflanze dadurch aus, daß sie eine erhöhte Transportkapazität für ATP in die Chloroplasten-Hüllmembran aufweist.

5 Gegenstand der Erfindung ist ferner ein ATP/ADP-Translokator-Gen zum Einsatz in eine der zuvor beschriebenen Pflanzen mit einer für die in Fig. 1 angegebenen Aminosäuresequenz kodierenden Nukleotidsequenz aus *Arabidopsis thaliana* (EMBL Accession Nr. Z49227).

10 Erfindungsgemäß ist hier der Einsatz eines jeden ATP/ADP-Translokator-Gens aus Organismen denkbar, die Chloroplasten besitzen. Bevorzugt sind Pflanzen im allgemeinen, Grünalgen oder Moose.

Das ATP/ADP-Translokator-Gen ist normalerweise in der inneren
15 Chloroplasten-Hüllmembran lokalisiert. Dort ist es für den Antiport, also den entgegengesetzt gerichteten Transport von ATP und ADP zuständig, indem es chloroplastidäres ADP im Austausch gegen ATP ins Cytosol exportiert. Durch die erhöhte Aktivität dieses ATP/ADP-Translokators wird die Menge an ATP im Chloroplasten erhöht (Neuhaus et al., 1997, The
20 Plant Journal 11: 73-82). Tjaden et al (1998, Plant Journal 16: 531-540) konnte zeigen, daß die Aufnahme von ATP in Chloroplasten von Kartoffeln durch Überexpression des ATP/ADP-Translokators um durchschnittlich 50 % über der Aufnahmekapazität des Wildtyps liegt. Diese vermehrt zur Verfügung stehenden energiereichen ATP Moleküle
25 können zur gesteigerten Biosynthese von Stärke und Fettsäuren genutzt werden, wie bei Möhlmann et al., 1994, Planta, 194: 492-497; Neuhaus et al. 1993, Plant Physiology 101: 573-578; Tjaden et al, 1998, Plant Journal 16: 531-540 beschrieben ist.

30 Erfindungsgemäß kann auch ein ATP/ADP-Translokator-Gen mit einer im wesentlichen gleichwirkenden natürlichen, chemisch synthetisierten,

modifizierten, artifiziell erzeugten Nukleotidsequenz oder mit heterologen Nukleotidsequenzen kodierend für einen ATP/ADP-Translokator oder Allelvariationen oder Isoformen davon oder mit Mischungen davon eingesetzt werden.

5

Gleichwirkende Sequenzen, die für ein ATP/ADP-Translokator-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Gleichwirkende Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der beschriebenen Sequenzen sowie z.B. durch chemische
10 Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einer gleichwirkenden Nukleotidsequenz versteht man insbesondere
15 auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für einen ATP/ADP-Translokator kodierenden Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigt. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche
20 Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der ATP/ADP-Translokator-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

25

Gleichwirkende Nukleotidsequenzen sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

30

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschten Eigenschaften vermitteln. Solche

artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die eine ATP/ADP-Translokator-Aktivität aufweisen oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzen genetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

10

Ferner schließt die Erfindung ein ATP/ADP-Translokator-Gen ein, welches mit regulativen Nukleotidsequenzen operativ verknüpft ist. Zu den regulativen Sequenzen zählt unter anderem auch ein vorgeschalteter Promotor, der eine Expression in Pflanzen ermöglicht.

15

Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung beispielsweise von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Als Promotor ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise wird ein pflanzlicher Promotor oder ein Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt verwendet. Insbesondere bevorzugt ist der CAMV 35SPromotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J, 8 (1989), 2195-2202).

30

Weitere zur operativen Verknüpfung bevorzugte aber nicht darauf beschränkte Sequenzen sind Transkriptionsterminatoren und

Translationsverstärker, wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693-871 1).

Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die
5 Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden. Bevorzugt können
die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit
einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für
die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat
der Linker 1 bis 10, bevorzugt 1 bis 8, besonders bevorzugt 2 bis 6
10 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der
regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig
weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl
nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze
sein.

15 Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Genstruktur enthaltend ein
ATP/ADP-Translokator-Gen sowie mit diesem Gen operativ verknüpfte
regulative Sequenzen sowie ein Vektor enthaltend ein ATP/ADP-
Translokator-Gen oder eine Genstruktur wie zuvor beschrieben. Hierbei
20 kann der Vektor zusätzliche regulative Nukleotidsequenzen, bevorzugt
aus der Gruppe der Promotoren, Terminatoren oder
Translationsverstärker sowie Nukleotidsequenzen für die Replikation in
einer entsprechenden Wirtszelle oder zur Integration in deren Genom
enthalten.

25 Unter Verwendung an sich bekannter Rekombinations- und
Klonierungstechniken können die Genstrukturen in geeignete Vektoren
kloniert werden, die ihre Vermehrung in Wirtszellen, wie beispielsweise
Pflanzen, Pflanzengeweben oder -zellen ermöglichen. Geeignete
30 Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and
Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

Für *E. coli* als Wirtszelle sind als Klonierungsvektoren vor allem pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC1 84 bevorzugt. Besonders bevorzugt sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch
5 beispielsweise in Agrobakterien replizieren können. Beispielfhaft sei hierfür der pBIN19 genannt (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 871 1). Beispielfhaft kann die erfindungsgemäße Genstruktur auch in den Tabak-Transformationsvektor pBIN-AR-TP eingebaut werden.

10 Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer wie zuvor beschriebenen transformierten Pflanze, wobei ein ATP/ADP-Translokator-Gen, eine Genstruktur oder ein Vektor der zuvor beschriebenen Art durch gentechnische Methoden in die Pflanze oder Gewebe oder Zellen davon übertragen wird. Allgemein ist dabei unter der
15 Übertragung von DNA die Transformation von Pflanzen, -gewebe oder -zellen zu verstehen.

Geeignete Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen
20 Transformation sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode -, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte
25 Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S. D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205225) beschrieben.

Durch die vorliegende Erfindung ist es somit möglich, wirtschaftlich hochwertige Nutzpflanzen herzustellen, die sich durch einen wesentlich erhöhten Gehalt an Aminosäuren, insbesondere an essentiellen Aminosäuren, auszeichnen.

5

Die vorliegende Erfindung bezieht sich außerdem auf die Verwendung der transformierten Pflanze als Nutz- oder Futterpflanze. Da in den erfindungsgemäßen Nutzpflanzen insbesondere gleichzeitig mehrere essentielle Aminosäuren in ihrem Gehalt gesteigert werden können, entfällt in vorteilhafter Weise eine kostenintensive Supplementation der Futtermittel mit Aminosäuren, die nach konventionellen Methoden bislang separat hergestellt oder gewonnen werden und dem Futter extern beigemischt werden müssen.

15 Ferner findet die erfindungsgemäße transformierte Pflanze, deren Samen und Nachkommen sowie Gewebe oder Zellen davon oder Extrakten daraus in Bereichen der Landwirtschaft, Futtermittelindustrie, Pharmaindustrie oder im Gesundheitswesen Anwendung.

20 Nachfolgend wird die vorliegende Erfindung durch Ausführungsbeispiele näher erläutert, die jedoch nicht limitierend im Sinne der Erfindung sind:

1. Allgemeine Klonierungsverfahren

Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al (1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

30

Die verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue) wurden von Stratagene (Heidelberg) oder Qiagen (Hilden) bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kan) wurde von Deblaere et al. in Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777 beschrieben. Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden.

Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103-119) pBluescript SK-(Stratagene), pGEM-T (Promega), pZerO (Invitrogen) pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711-8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221-230) benutzt werden.

2. Transformation von Agrobakterien

Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurde entsprechend der Methode von Höfgen und Willmitzer (Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877) ausgeführt. Die Anzucht der Agrobakterien erfolgte in YEB Medium (Vervliet et al., J. Gen. Virol. (1975) 26, 33).

3. Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech., Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

4. Konstruktion eines Pflanzentransformationsvektor mit AATP1 in Sense-Orientierung

Für die Konstruktion eines Vektors zur Transformation von Pflanzen wird ein 2230 bp langes EcoRV/BamHI-Fragment der AATP1-cDNA aus *Arabidopsis thaliana* (Beschreibung der Klonierung von AATP1 aus

Arabidopsis thaliana in Kampfenkel et al., FEBS Letters 374 (1995), 351-355 und Neuhaus et al., The Plant Journal 11: 73-82) in einen mit SmaI/EcoRV und BamHI geschnittenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 223-230) ligiert. Durch die Insertion des
5 cDNA-Fragmentes entsteht ein Genkonstrukt, das den 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus (540bp) und die proteincodierende Region des ADP/ATP-Translokators 1 aus Arabidopsis thaliana (AATP1) enthält. Das cDNA-Fragment wird in Sense-Orientierung mit dem 35S-Promotor in pBinAR fusioniert. In 3'-Richtung des inserierten AATP1-Fragments folgt
10 das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase-Gens aus Agrobacterium tumefaciens (215 bp).
Die Gesamtgröße des Plasmids pBIN AR-AATP1 (Fig. 3) beträgt ca. 14,2 kb.

15 5. Einführung des Plasmids pBINAR-AATP1 in das Genom von
Kartoffelpflanzen

Das Plasmid wird mit Hilfe von Agrobacterium tumefaciens wie bei Rocha-Sosa et al. beschrieben (EMBO J. 8 (1989), 23-29), in
Kartoffelpflanzen transferiert. Als Positivkontrolle der Transformation
20 dienen transgene Kartoffelpflanzen, die eine Erhöhung der mRNA des plastidären ADP/ATP-Translokators 1 aufweisen. Dies wird mittels Northern Blot-Analyse nachgewiesen. Dazu wird RNA nach Standardprotokollen aus Blatt- und Knollengewebe von Kartoffelpflanzen isoliert. 50 µg RNA werden auf einem Agarosegel aufgetrennt (1,5 %
25 Agarose, 1 x MEN-Puffer, 16,6 % Formaldehyd). Nach der Elektrophorese wird die RNA mit 20 x SSC mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran Hybond N (Amersham, UK) übertragen. Die RNA wird auf der Membran durch UV-Bestrahlung fixiert, die Membran in Phosphathybridisierungspuffer (Sambrook et al., 1989, Cold Spring
30 Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) für 2 h prähybridisiert und

anschließend durch Zugabe der radioaktiv markierten Sonde für 10 h hybridisiert.

6. Konstruktion eines Pflanzentransformationsvektors mit AATP1 in

Antisense-Orientierung

Für die Konstruktion eines Vektors zur Transformation von Pflanzen wird ein 1265 bp langes BamH/NdeI-Fragment, bei dem die NdeI-Schnittstelle mit T4-Polymerase zur blunt-end Schnittstelle aufgefüllt wird, aus der kodierenden Region der AATP1-cDNA aus *S. tuberosum* (Beschreibung der Klonierung von AATP1 aus Kartoffel in Tjaden et al., 1998, The Plant Journal 16: 531-540) in einen mit SmaI und BamHI geschnittenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 221-230) ligiert. Die NdeI-Schnittstelle liegt in der AATP1 cDNA, die BamHI-Schnittstelle stammt aus dem Vektor pTM1 (Tjaden et al., 1998, The Plant Journal 16: 531-540). Durch die Insertion des cDNA-Fragmentes entsteht ein Genkonstrukt, das den 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus (540bp) und eine 1265 bp lange Region eines ADP/ATP-Translokators 1 aus *S. tuberosum* (AATP1 S.t.) in Antisense-Orientierung enthält. Das Fragment wurde mit dem 35S-Promotor in pBinAR fusioniert. In 3'-Richtung des inserierten AATP1-Fragments folgt das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (215 bp).

Die Gesamtgröße des Plasmids pBIN AR-AS-AATP1 (Fig. 4) beträgt ca. 13,3 kb.

7. Einführung des Plasmids pBINAR-ASAATP1 in das Genom von Kartoffelpflanzen

Die Übertragung des Plasmids erfolgt in analoger Weise wie unter Punkt 5 beschrieben.

Als Ergebnis der Transformation zeigten transgene Kartoffelpflanzen eine Verringerung der mRNA eines plastidären ADP/ATP-Translokators. Dies wird mittels Northern Blot-Analyse nachgewiesen. Dazu wird RNA nach Standardprotokollen aus Blatt- und Knollengewebe von Kartoffelpflanzen isoliert. 50 µg RNA wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (1,5 % Agarose, 1 x MEN-Puffer, 16,6 % Formaldehyd). Nach der Elektrophorese wurde die RNA mit 20 x SSC mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran Hybond N (Amersham, UK) übertragen. Die RNA wird auf der Membran durch UV-Bestrahlung fixiert. Die Membran wird in Phosphathybridisierungspuffer (Sambrook et al., a.a.O) für 2 h prähybridisiert und anschließend durch Zugabe der radioaktiv markierten Sonde für 10 h hybridisiert.

8. Aminosäureanalytik

15

Die Aminosäuren (mit Ausnahme von Prolin) wurden durch HPLC-Auftrennung in ethanolischen Extrakten gemessen (nach Geigenberger et al., 1996, Plant Cell & Environ 19: 43-55).

8.1 Herstellung der ethanolischen Extrakte

Jeweils zwei Kartoffelscheiben (zusammen ca. 0.2 g Frischgewicht) werden in zwei aufeinanderfolgenden Schritten mit jeweils 7 ml 80 % (v/v) Ethanol und 7 ml 50 % Ethanol für 30 min. bei 80 °C extrahiert. Der Gesamtextrakt (Volumen ca. 14 ml) dient zur Bestimmung der Aminosäuren.

8.2 Bestimmung der Aminosäuregehalte durch HPLC

Der Nachweis der Aminosäuren erfolgt fluorometrisch nach Vorsäulenderivatisierung der primären Aminogruppe mit o-Phthalsäuredialdehyd (OPA). Hierzu injizierte ein Probengeber (Autosampler 465, Kontron, Eching) bei 4 °C in 35 µl vorgelegten Extrakt

35 µl OPA-Reagenz, bestehend aus einer Mischung von 5 % (g/v) OPA in Methanol, 0.8 M Boratpuffer (pH 10.4 mit KOH) und 3-Mercaptopropionsäure (10:90:1; v:v:v). Nach 108 Sekunden wurden 20 µl der derivatisierten Probe injiziert.

5 Laufmittel A ist eine Mischung von 1000 ml 12 mM Na-Phosphat (pH 6.8) und 1.6 ml Tetrahydrofuran. Laufmittel B besteht aus einer Mischung von 250 ml 12 mM Na-Phosphat (pH 6.8), 175 ml Methanol und 110 ml Acetonitril. Die Trennbedingungen sind wie folgt: 0-2 min, isokratische Phase mit 0 % B, 2-11 min., linearer Gradient von 0 auf 10 % B, 11-17
10 min., 10 % B, 17-27 min., linearer Gradient von 10 auf 50 % B, 27-38 min., linearer Gradient von 50 auf 60 % B, 38-44 min., linearer Gradient von 60 auf 100 % B, 44-46 min., 100 % B, 46-48 min., 100 auf 0 % B, 48-60 min., 0 % B. Zur Trennung wird ein Hypersil ODS-Säule (3 µm Partikelgröße, 150 mm Länge, 4.6 mm Durchmesser, Knauer GmbH,
15 Berlin) verwendet. Die vom Fluorimeter (SFM25, Kontron, Eching) detektierten Signale (Excitationswellenlänge = 330 nm, Emissionswellenlänge = 450 nm) werden vom Datensystem 450-MT (Kontron, Eching) integriert und ausgewertet.

20 8.3 Bestimmung des Prolingehaltes

Die Bestimmung des Prolingehaltes erfolgt nach Bates et al., 1973, Plant Soil 39: 205-207.

Zu 200 µl Extrakt werden 500 µl einer Mischung von 2 Teilen 6 M H₃PO₄ und 3 Teilen 75 % Essigsäure, sowie 500 µl Ninhydrinlösung (600 mg pro
25 20 ml 75 % Essigsäure) zugegeben. Nach 45 min Inkubation bei 95-100 °C, wird der Testmix auf Eis gestellt und mit 300 µl Toluol vermischt. Nach erfolgter Phasentrennung wird die obere Phase in eine Microküvette transferiert und die OD bei 515 nm gemessen. Der Prolingehalt wird durch Vergleich mit einer Eichgeraden (1-50 µM Prolin) ermittelt.

Tab. 1: Übersicht über den Gehalt an Aminosäuren im Wildtyp von *Solanum tuberosum*, sowie den entsprechend transformierten Kartoffelpflanzen, die das Gen für den ATP/ADP-Translokator in *Sense*-Orientierung (Sense-98 und Sense-62) bzw. in *Antisense*-Orientierung (Antis-594 und Antis-595) enthalten.

Genotyp	Aspartat	Glutamat	Asparagin	Serin	Glutamin
Wildtyp	2,020	2,090	11,190	1,066	5,586
Sense-98	1,656	2,238	8,986	1,008	7,409
Sense-62	1,924	1,540	12,533	0,838	6,949
Antis-594	0,746	4,123	1,256	0,875	5,633
Antis-595	0,880	4,670	4,344	1,057	6,931
Genotype	Tyrosin	Valin	Methionin	Tryptophan	Phenylalanin
Wildtyp	1,201	3,589	0,986	0,519	1,544
Sense-98	1,840	4,010	1,098	0,780	2,286
Sense-62	1,440	3,633	0,920	0,506	1,620
Antis-594	0,474	2,620	0,403	0,143	2,039
Antis-595	0,228	2,340	0,510	0,019	1,716
Genotyp	Glycin	Threonin	Histidin	Alanin	Arginin
Wildtyp	0,473	1,168	0,699	1,036	1,809
Sense-98	0,507	1,318	0,865	1,694	2,122
Sense-62	0,442	1,197	0,838	1,165	2,008
Antis-594	0,448	0,612	0,265	1,824	0,493
Antis-595	0,641	0,574	0,292	1,562	0,396

Genotyp	Isoleucin	Leucin	Lysin	Prolin	Total freie AS
Wildtyp	1,450	0,212	1,027	0,595	41,7
Sense-98	1,819	0,296	1,310	0,552	44,7
Sense-62	1,445	0,195	1,291	0,546	43,9
Antis-594	0,681	0,142	0,270	0,451	27,7
Antis-595	0,535	0,124	0,228	0,470	33,0

Alle Angaben in $\mu\text{mol/gFW}^{-1}$

Patentansprüche:

1. Transformierte Pflanze und deren Nachkommen dadurch
5 gekennzeichnet, daß sie in den regulativen Sequenzen und/oder der
Genkopienzahl eines ATP/ADP-Translokator-Gens derart verändert
ist, daß sie gegenüber einer entsprechenden nicht transformierten
Pflanze eine bis mehrere Aminosäuren in veränderten Mengen
aufweist.
- 10 2. Transformierte Pflanze und deren Nachkommen nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß sie eine erhöhte Transportkapazität für
ATP in die Chloroplasten-Hüllmembran aufweist.
- 15 3. Transformierte Pflanze und deren Nachkommen nach einem der
Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie überwiegend
eine oder mehrere essentielle Aminosäure(n) in veränderten Mengen
aufweist.
- 20 4. Transformierte Pflanze und deren Nachkommen nach einem der
Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine oder
mehrere essentielle Aminosäure(n) aufweist, deren Gehalt gegenüber
der nicht transformierten Pflanze gesteigert ist.
- 25 5. Transformierte Pflanze und deren Nachkommen nach einem der
Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nutzpflanze
ist.
- 30 6. ATP/ADP-Translokator-Gen zum Einsatz in eine Pflanze nach einem
der Ansprüche 1 bis 5 mit einer für die in Fig. 1 angegebenen

Aminosäuresequenz kodierenden Nukleotidsequenz aus *Arabidopsis thaliana* (EMBL Accession Nr. Z49227).

- 5 7. ATP/ADP-Translokator-Gen nach Anspruch 6 mit einer im wesentlichen gleichwirkenden natürlichen, chemisch synthetisierten, modifizierten, artifiziell erzeugten Nukleotidsequenz oder mit heterologen Nukleotidsequenzen kodierend für einen ATP/ADP-Translokator oder Allelvariationen oder Isoformen davon oder mit Mischungen davon.
- 10 8. ATP/ADP-Translokator-Gen nach einem der Ansprüche 6 oder 7 mit operativ verknüpften regulativen Nukleotidsequenzen.
- 15 9. ATP/ADP-Translokator-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 8 mit einem vorgeschalteten operativ verknüpften Promotor.
- 20 10. Genstruktur enthaltend ein ATP/ADP-Translokator-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 9 sowie mit diesem Gen operativ verknüpfte regulative Sequenzen.
- 25 11. Vektor enthaltend ein ATP/ADP-Translokator-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 9 oder eine Genstruktur nach Anspruch 10.
- 30 12. Vektor nach Anspruch 11 enthaltend zusätzliche regulative Nukleotidsequenzen, bevorzugt aus der Gruppe der Promotoren, Terminatoren oder Translationsverstärker sowie Nukleotidsequenzen für die Replikation in einer entsprechenden Wirtszelle oder zur Integration in deren Genom.
13. Samen der Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 5.

14. Gewebe oder Zellen oder fortpflanzungsfähiges Material der Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 5.

5 15. Verfahren zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Aminosäuregehalt nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein ATP/ADP-Translokator-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 9 oder eine Genstruktur nach Anspruch 10 oder ein Vektor nach einem der Ansprüche 11 oder 12 durch gentechnische Methoden übertragen wird.

10

16. Verwendung der transformierten Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als Nutz- oder Futterpflanze.

15 17. Verwendung der transformierten Pflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder Gewebe oder Zellen davon oder von Extrakten daraus in Bereichen der Landwirtschaft, Futtermittelindustrie, Pharmaindustrie oder im Gesundheitswesen.

Fig. 1: *Arabidopsis thaliana* cDNA entsprechend dem kodierenden Bereich des chloroplastidären ATP/ADP-Translokators 1 (EMBL Accession Nummer Z49227)

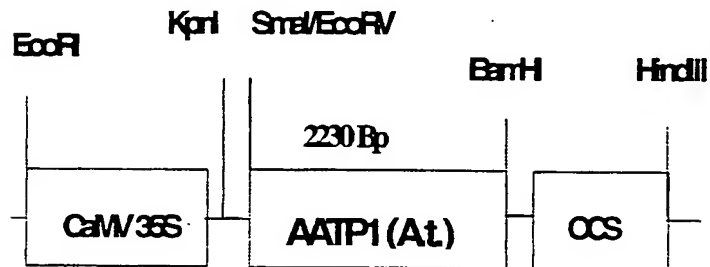
```
5  atggaagctgtgattcaaaccagagggcttctctttacccaccaaaccatcggagtgagaagcca
   acttcagccttcccatggcttaaagcagagactttcgccggaagccaagaaatctacatgggtgtct
   ctatcctttaacgggcacaagaaattcaaacctttgagccaaccctgcatgggatttcgattcccaca
   aagagagaagcaccgagttcatatgcaaggcggaggcgcggtgctggcgacggagctgtcttcg
   gcgaagcgattccgcagctgtttagcctcgcggaagatttcggtgtggagggtgcaaccttgaaaaa
10  gattatccctttaggattgatgttctttgtattctttcaattacacaattctgagggaatacaaaggatgtcttg
   gtggtagcggcgaaaggaagtctgctgagattataccttctgaagacttgggtgaatcttctctatggc
   cattgggttatgtctctactactaaactctccaatgttctctccaagaaggctctgtttacactgttattgtc
   ccttcatcatctactttgggggcttgggttcgtcatgtaccctctcagcaactatattcacccggaagctct
   cgcagataagctccttacaaccctcgcccaagattcatgggtcctattgcaatattgcggatttgaggt
15  tctgtttgtttatgttatggctgagcttggggtagtgtgtgtgtcagttctcttctggggcttggctaatacag
   atcacaactgtggatgaagccaagaaattctatccttgttcggcattggagccaatgttgactgatttc
   tcaggaagaaccgtgaaatacttcttaacttgagaaagaatcttggctcctggagttgacggcagtttcg
   ttgaaagccatgatgagcatttgtgtgggaatgggactcgattgtctctctattgtgtgggtcgaataga
   tatgttctcttccaaccgtagcaagaacaagaaggagaaaccgaagatgggaacgatggaaag
20  ctggaagtcttggatcatcaccatacattagagatcttgctactttagtggtggcatacgggtattagtatca
   atcttgtggaagtcacatggaaatcaaagcttaaagctcagttccctagcccgaatgagtactcagcatt
   tatgggagcatttcaacctgcacgggtgttgaacattcacaatgatgcttctcagccaatacgtattca
   ataagtatggttggggagtagctgcaaagatcacccaactgttctgctattgactgggtgttgcgttcttct
   ctctaattattgttggcgggccattcgcaccactgttgccaagcttggtatgacaccgctacttgcagctgt
25  gtagtgcggtgcccttcagaatatcttcagcaagagtccaagtacagctgttcgacccttgcaaagaa
   atggcctatatccattggatgaggacaccaagggttaaaggcaaagctgcgattgacgtggtctgcaa
   ccattaggaaaatcagggggagctttaatacagcagttcatgatcttatccttggatcactagcgaatt
   caacgccgtatctaggaatgatcttgttgggtattgtcactgcgtggttagctgcagctaagtcgctggag
   ggacagttcaacagcttgcgtctgaagaagagcttgagaaggaaatggagagagcttcatcggtga
```


Fig. 2: *Solanum tuberosum* cDNA entsprechend dem kodierenden Bereich des chloroplastidären ATP/ADP-Translokators 1 (EMBL Accession Nummer Y10821)

```
5  atggaagggtgtttacaaacaagagggcctcttcttgccttctaaacccaaaatcaaggcttttaccat
   tgcctcaagggggtctaaggaacagattcaattctttaagtagttaaagcctaatacctttaatggggtt
   cttatcttcaaatagggttcaaaaagtcaaggcttgacacaaagcctcagttgttggccaaaagaag
   aggtgtttccaatatgcaaagctgaggctgctgctgctgctggtgcagctgatggacagccacttttgtt
   gaaaaggagcaacctaagttatggggattgaactgtgacccttaagaaaattataccacttggggcg
10 atgttctttgtattctgtttaattatacaatccttagggatactaaggatgtgttggtgtaacagctaaagg
   tccagtgtgagattatcccttctgaaaacttgggtgaattgcctatggctattggattcatgctttgtac
   acaaagttggctaatagtgtgtcaaaggaggctctttttatactgttatacttcttttattgcattcttggggc
   gtttggtttgtttgtatcctcttagcaattactttcacctacagcttttctgataagcttctcaatacccttgg
   tccaagatttcttgaccaattgctattctgaggatctggagttctgcttctatgtcatggctgagcttgg
15 gggaaagtgtggtggttcagtactctttggggatttgctaatacagatcacgactgtcgatgaggctaaga
   gattctatcccttgtttggacttggagcgaatgttgctcttatttctctggtcgcacagtgaagtactttctag
   ctgagaagctctttaggtcctggagttgatggttgggctatctccctgaaaggaatgatgagtattgtgt
   gatgatgggtggggcaatctgttctttactgggtgggtgaatagaaatgttgctctcccaactcgtagcaa
   gaagaagaaggtaaaacctaacatgaccacaatggagagcttgaagttcttggctcttcaaaaatatat
20 cagggatcttgccacattggtgtagcatatggcattagatcaaccttgttgaagttacatggaagtcaa
   agctcaaagctcagttcccaagcccaatgaatactcctcattcatgggtgacttctcaactgctactgg
   aatagcaactttcacaatgatgttgtaagtcaatggattttcgacaagtatgggtggggagcagcagcc
   aagataacacctacagtcttgctccttaccggagttggttcttctccctgctttgtttggggcaccttagc
   acctactcttgcaagtttggaaatgactcctctttagcagctgtctatgtgggtgcaatgcagaacatttc
25 agtaagagtgcaaagtatatgtttgttgacccctgcaaagaaatggcctacattccttggatgaggaca
   ccaagggttaaagggaaggcagcaatcgatgttgtctgcaatccactgggaaagtctggaggagctttg
   atacaacagttcatgatttgacttttggtcacttgccagctcgacaccctaccttggcgggtgtgctcttagt
   aattgttctgcatggttgggagcagccaagtcttggatggacagttcactcaattacgccaagaagaa
   gatcttgagaaggaaatggagagagcatcggtgaagatccctgtcgtgtctcaaaatgaaaatggaa
30 atggctctctcaagtgagtcataactaaatcccgctggaggtgactctaccaacgcttcatcggaacc
   ctctccccaaggagcctgtaa
```


3/4

Fig. 3: Pflanzentransformationsvektor pBIN-AR-AATP1 zur Expression des ATP/ADP-Translokators in *Sense*-Orientierung



5

CaMV 35S: 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus

AATP1 (A.t.): EcoRV/BamHI-Fragment des ATP/ADP-Translokators 1 in
Sense-Orientierung aus *Arabidopsis thaliana*

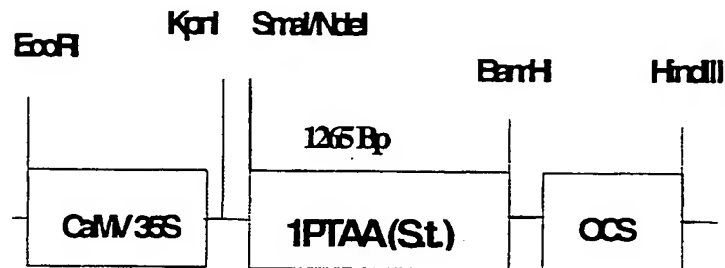
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase-Gens aus
Agrobacterium tumefaciens

10

Außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur
einmal den Vektor schneiden.

15

Fig. 4: Pflanzentransformationsvektor pBIN-AR-AATP1-AS zur Expression des ATP/ADP-Translokators in *Antisense*-Orientierung



5

CaMV 35S: 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus

1PTAA (S.t.): BamHI/NdeI-Fragment des ATP/ADP-Translokator-Gens in Antisense-Orientierung aus *Solanum tuberosum*

OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*

10

Außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C12N15/29 C07K14/415 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

STRAND, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TJADEN JOACHIM ET AL: "Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato (<i>Solanum tuberosum</i> L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch." PLANT JOURNAL, vol. 16, no. 5, December 1998 (1998-12), pages 531-540, XP000960526 ISSN: 0960-7412 page 532, right-hand column page 538, right-hand column	1-5, 13-17
X	WO 94 10320 A (MOGEN INT ; SIJMONS PETER CHRISTIAAN (NL); GODDIJN OSCAR JOHANNES M) 11 May 1994 (1994-05-11) the whole document	1, 3, 5, 13, 14, 16, 17
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 November 2000

Date of mailing of the international search report

28/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Herrmann, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 00/07625

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAMPFENKEL KARLHEINZ ET AL: "Molecular characterization of an Arabidopsis thaliana cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants." FEBS LETTERS, vol. 374, no. 3, 1995, pages 351-355, XP000960469 ISSN: 0014-5793 abstract figure 1	6-12
X	& DATABASE EMBL 'Online! Accession No. Z49227, 3 November 1995 (1995-11-03) KAMPFENKEL, K.K.: "A. thaliana mRNA for adenine nucleotide translocase" the whole document	6-8, 10-12
P,X	WO 99 58654 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;MOEHLMANN TORSTEN (DE); MARTINI NORBERT () 18 November 1999 (1999-11-18) page 5, line 8-15 claims 1-3	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/07625

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9410320	A	11-05-1994	AU 5420594 A	24-05-1994
			CA 2148451 A	11-05-1994
			EP 0666922 A	16-08-1995
WO 9958654	A	18-11-1999	AU 4261099 A	29-11-1999



2

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH GEGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KAMPFENKEL KARLHEINZ ET AL: "Molecular characterization of an Arabidopsis thaliana cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants." FEBS LETTERS, Bd. 374, Nr. 3, 1995, Seiten 351-355, XP000960469 ISSN: 0014-5793 Zusammenfassung Abbildung 1	6-12
X	& DATABASE EMBL 'Online! Accession No. Z49227, 3. November 1995 (1995-11-03) KAMPFENKEL, K.K.: "A. thaliana mRNA for adenine nucleotide translocase" das ganze Dokument	6-8, 10-12
P,X	WO 99 58654 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;MOEHLMANN TORSTEN (DE); MARTINI NORBERT () 18. November 1999 (1999-11-18) Seite 5, Zeile 8-15 Ansprüche 1-3	1-17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07625

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9410320	A	11-05-1994	AU	5420594 A	24-05-1994
			CA	2148451 A	11-05-1994
			EP	0666922 A	16-08-1995
WO 9958654	A	18-11-1999	AU	4261099 A	29-11-1999



7
.

7
.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSSTANDES
 IPK 7 C12N15/82 C12N17/29 C07K14/415 A01H5/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

STRAND, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBL

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
11 X	TJADEN JOACHIM ET AL: "Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato (<i>Solanum tuberosum</i> L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch." PLANT JOURNAL, Bd. 16, Nr. 5, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 531-540, XP000960526 ISSN: 0960-7412 Seite 532, rechte Spalte Seite 538, rechte Spalte ---	1-5, 13-17
12 X	WO 94 10320 A (MOGEN INT ;SIJMONS PETER CHRISTIAAN (NL); GODDIJN OSCAR JOHANNES M) 11. Mai 1994 (1994-05-11) das ganze Dokument --- -/--	1,3,5, 13,14, 16,17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. November 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Herrmann, K

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
D ₃ X	KAMPFENKEL KARLHEINZ ET AL: "Molecular characterization of an Arabidopsis thaliana cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants." FEBS LETTERS, Bd. 374, Nr. 3, 1995, Seiten 351-355, XP000960469 ISSN: 0014-5793 Zusammenfassung Abbildung 1	6-12
D ₄ X	& DATABASE EMBL 'Online! Accession No. Z49227, 3. November 1995 (1995-11-03) KAMPFENKEL, K.K.: "A. thaliana mRNA for adenine nucleotide translocase" das ganze Dokument	6-8, 10-12
I ₅ P,X	WO 99 58654 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;MOEHLMANN TORSTEN (DE); MARTINI NORBERT () 18. November 1999 (1999-11-18) Seite 5, Zeile 8-15 Ansprüche 1-3	1-17

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9410320	A	11-05-1994	AU	5420594 A	24-05-1994
			CA	2148451 A	11-05-1994
			EP	0666922 A	16-08-1995
WO 9958654	A	18-11-1999	AU	4261099 A	29-11-1999

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AM DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0050/050729 BASF/NAE	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 07625	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 05/08/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 15/09/1999
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbaren **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐

Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____



wie vom Anmelder vorgeschlagen



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C12N15/29 C07K14/415 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

STRAND, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBL

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	TJADEN JOACHIM ET AL: "Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato (<i>Solanum tuberosum</i> L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch." PLANT JOURNAL, Bd. 16, Nr. 5, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 531-540, XP000960526 ISSN: 0960-7412 Seite 532, rechte Spalte Seite 538, rechte Spalte ---	1-5, 13-17
X	WO 94 10320 A (MOGEN INT ; SIJMONS PETER CHRISTIAAN (NL); GODDIJN OSCAR JOHANNES M) 11. Mai 1994 (1994-05-11) das ganze Dokument --- -/--	1,3,5, 13,14, 16,17



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. November 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Herrmann, K

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEKÜNDIGTE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KAMPFENKEL KARLHEINZ ET AL: "Molecular characterization of an Arabidopsis thaliana cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants." FEBS LETTERS, Bd. 374, Nr. 3, 1995, Seiten 351-355, XP000960469 ISSN: 0014-5793 Zusammenfassung Abbildung 1	6-12
X	& DATABASE EMBL 'Online! Accession No. Z49227, 3. November 1995 (1995-11-03) KAMPFENKEL, K.K.: "A. thaliana mRNA for adenine nucleotide translocase" das ganze Dokument	6-8, 10-12
P,X	WO 99 58654 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;MOEHLMANN TORSTEN (DE); MARTINI NORBERT () 18. November 1999 (1999-11-18) Seite 5, Zeile 8-15 Ansprüche 1-3	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/07625

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9410320	A	11-05-1994	AU	5420594 A		24-05-1994
			CA	2148451 A		11-05-1994
			EP	0666922 A		16-08-1995
<hr/>						
WO 9958654	A	18-11-1999	AU	4261099 A		29-11-1999
<hr/>						

